



麦红吸浆虫 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因 *SmHMGR* 的克隆及在滞育与发育变态过程中的表达动态

刘禹含¹, 梁婷婷¹, 赵佳佳¹, 成卫宁^{1,*}, 朱克岩²

(1. 西北农林科技大学, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西杨凌 712100;

2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

摘要:【目的】3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)是保幼激素(JH)合成途径的限速酶。麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 是一种典型的专性幼虫滞育昆虫。本研究旨在探讨 *HMGR* 基因在麦红吸浆虫滞育和发育变态过程中的作用。【方法】通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆麦红吸浆虫滞育前幼虫 *HMGR* 基因全长 cDNA 序列;利用生物信息学软件分析 *HMGR* 基因核苷酸和其编码的蛋白氨基酸序列特性;采用 qPCR 技术测定其在麦红吸浆虫滞育不同时期 3 龄幼虫及不同发育阶段(1–2 龄幼虫、预蛹、初蛹、中蛹和后蛹以及雌雄成虫)中的 mRNA 表达水平。【结果】克隆获得一条麦红吸浆虫 *HMGR* 基因全长 cDNA 序列,命名为 *SmHMGR*(GenBank 登录号: MG876766)。该基因全长 2 548 bp,其中开放阅读框长 2 328 bp,编码 775 个氨基酸,预测的蛋白分子量为 84.16 kD,理论等电点为 8.29。序列分析发现该基因编码的蛋白具有 HMGR 蛋白家族典型的 HMG-CoA-reductase-class I 催化功能域及其他保守功能基序;序列比对和系统发育分析表明,*SmHMGR* 与达氏按蚊 *Anopheles darlingi* 等长角亚目(Nematocera)昆虫 HMGR 的相似性最高、亲缘关系最近。*SmHMGR* 在麦红吸浆虫滞育前的 3 龄早期幼虫中表达量显著升高,进入滞育后一直维持较高水平,并在滞育后静息阶段的当年 12 月至翌年 1 月达到最高。*SmHMGR* 在蛹期表达量低于幼虫期,预蛹期表达量最低;在雌成虫中表达量显著高于在蛹和雄成虫中的表达量。【结论】*SmHMGR* 的表达与麦红吸浆虫发育密切相关,可能在滞育诱导、维持及滞育后静息状态的维持及生殖中发挥作用,其表达量的降低可能参与了幼虫到蛹的变态。

关键词: 麦红吸浆虫; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因克隆; 滞育; 发育; 变态

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)10-1140-10

Cloning and expression dynamics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene *SmHMGR* during diapause and metamorphosis in *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae)

LIU Yu-Han¹, LIANG Ting-Ting¹, ZHAO Jia-Jia¹, CHENG Wei-Ning^{1,*}, ZHU Ke-Yan² (1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

Abstract: 【Aim】3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) is a rate-limiting enzyme

of juvenile hormone (JH) synthesis. This study aims to explore the potential roles of *HMGR* gene in diapause and metamorphosis of *Sitodiplosis mosellana*, an insect species undergoing obligatory larval diapause. 【Methods】The full-length cDNA of *HMGR* gene was cloned from *S. mosellana* pre-diapause larvae by RT-PCR and RACE technologies. The sequence characteristics of the nucleotide and amino acid sequences of the cloned *HMGR* were analyzed by bioinformatics programs. The mRNA expression levels of *HMGR* in the 3rd instar larva of *S. mosellana* in different stages of diapause (pre-diapause, diapause, post-diapause quiescent and post-diapause development) and different developmental stages (the 1st – 2nd instar larva, pre-pupa, early pupa, middle pupa and late pupa, as well as male adult and female adult) were determined by qPCR. 【Results】The full-length cDNA sequence of *HMGR* was obtained from *S. mosellana* and named *SmHMGR*, which was deposited at GenBank under the accession number MG876766. *SmHMGR* is 2 548 bp in length and contains a 2 328 bp ORF, encoding a protein of 775 amino acids with a predicted molecular weight of 84.16 kD and a theoretical pI of 8.29. The deduced amino acid sequence contains the conserved HMG-CoA-reductase-class I domain and other motifs of the *HMGR* protein family. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *SmHMGR* has the highest similarity and the closest relationship to *HMGR*s from the Nematocera including *Anopheles darlingi*. The expression level of *SmHMGR* increased as the larvae entered the early 3rd instar before diapause, maintained high after diapause, and peaked in the post-diapause quiescence phase (from December to the next January). The expression level of *SmHMGR* was lower in the pupal stage than in the larval stage, the lowest in the pre-pupal stage, and significantly higher in female adults than in pupae and male adults. 【Conclusion】*SmHMGR* expression is related to the development of *S. mosellana*, and might play key roles in diapause induction, maintenance and post-diapause quiescence as well as in adult reproduction, whereas the metamorphosis from larva to pupa might be correlated with its reduced expression.

Key words: *Sitodiplosis mosellana*; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; gene cloning; diapause; developmental metamorphosis

保幼激素(juvenile hormone, JH)是由昆虫咽侧体合成并分泌到血淋巴中的一类倍半萜类化合物,不仅具有调控昆虫变态和生殖的功能(Riddiford *et al.*, 2010; Jindra *et al.*, 2013; Pamminer *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2018),对滞育也具有调节作用(Eizaguirre *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011)。滞育是昆虫抵御不良环境的重要生态对策,其特征是昆虫代谢速率缓慢(Košťál, 2006)。JH在幼虫滞育诱导和维持中的作用被普遍认同(Yin and Chippendale, 1973; Yagi and Akaike, 1976; Eizaguirre *et al.*, 1998; Munyiri and Ishikawa, 2004; Jiang *et al.*, 2011),但对个别的种类如竹螟 *Omphisa fucidentalis*, JH也调控幼虫滞育的终止(Singtripop *et al.*, 2000, 2008)。JH在成虫滞育终止过程中也发挥重要作用(Bajgar *et al.*, 2013; Smykal *et al.*, 2014)。

昆虫血淋巴中JH滴度的精确调控对发挥其作用至关重要(李胜等, 2004)。3-羟基-3-甲基戊二酰

辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *HMGR*)是JH合成途径的限速酶,催化HMG-CoA还原为甲羟戊酸,甲羟戊酸是昆虫萜类和脊椎动物胆固醇合成的前体(Gertler *et al.*, 1988; 刘艳等, 2007; Li *et al.*, 2017)。已有研究表明,*HMGR*参与多种昆虫JH合成、生长发育和生殖的调控,如在太平洋折翅蠅 *Diploptera punctata* 成虫的JH合成周期中,其咽侧体中*HMGR*活性与JH滴度呈明显的线性关系(Couillaud and Feyereisen, 1991);棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫*HMGR*表达被抑制后发育延缓,体重减轻(Tian *et al.*, 2015);*HMGR*抑制剂处理德国小蠊 *Blattella germanica*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 后,JH和卵黄蛋白合成降低、繁殖力下降(Debernard *et al.*, 1994; Zapata *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017)。滞育作为昆虫发育过程的特殊阶段,其发生发展进程受JH的调控(Eizaguirre *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011),但目前却尚未见*HMGR*与滞育

关系方面的研究报道。

麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 是小麦生产上间歇性猖獗成灾的重要害虫 (Miao *et al.*, 2013; Shrestha and Reddy, 2019), 同时又是一种典型的以幼虫进行专性滞育的昆虫。该虫成虫产卵盛期与各地小麦抽穗期吻合, 幼虫孵化后危害正在灌浆的小麦籽粒, 小麦黄熟后 3 龄老熟幼虫脱离麦穗钻入土中, 在土壤中结茧进入滞育, 每年 10 月后随着气温的降低, 滞育逐渐被终止, 12 月后所有个体终止滞育进入滞育后的静息期, 翌年 3 月随着气温的升高幼虫破茧恢复发育、化蛹和羽化 (Cheng *et al.*, 2017, 2018)。前期研究表明, JH 调控麦红吸浆虫滞育 (李英梅等, 2006), 但关于该虫 JH 合成途径相关基因的研究目前尚未见报道。为探讨麦红吸浆虫滞育和发育变态过程中 JH 滴度的调控机理, 明确 *HMGR* 在麦红吸浆虫生命活动中的作用, 本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得麦红吸浆虫 *HMGR* 基因, 并利用实时定量 PCR 技术检测该基因在滞育进程和发育变态过程的表达模式, 为进一步明确 JH 调控因子在麦红吸浆虫滞育和发育变态中的功能和开发抑制 JH 合成的生物杀虫剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试虫源为麦红吸浆虫 1–2 龄幼虫、滞育不同时期的 3 龄幼虫、各阶段蛹和雌雄成虫, 参考 Cheng 等 (2018) 的方法获取。2016 年小麦灌浆期, 在麦红吸浆虫严重发生的陕西省周至县麦田 (34°07'N, 108°53'E) 采集麦穗, 采用剥穗法获得各龄幼虫, 虫龄依据体型大小、颜色和“Y”型剑骨片区分 (Lamb *et al.*, 2000); 2016 年 5 月下旬大量采集感虫麦穗, 带回放入西北农林科技大学校内养虫圃 (此时收集部分麦穗老熟幼虫, 作为滞育前幼虫样本); 为满足虫体顺利入土进入滞育和翌年打破滞育对土壤湿度的要求, 适时浇水。然后从 2016 年 6 月大部分幼虫结茧进入滞育至 2017 年 2 月, 每月定期淘土采集结茧幼虫, 2017 年 3 月幼虫破茧恢复发育后至 2017 年 4 月上旬采集活动幼虫, 随后依次收集预蛹、初蛹、中蛹、后蛹及雌、雄成虫, 其中蛹阶段依据复眼和翅芽的发育程度和颜色区分 (武予清等, 2011)。所有样本收集后分装于 2.0 mL 冻存管, 液氮速冻后 -80℃ 保存。

1.2 麦红吸浆虫总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

以麦穗上采集的麦红吸浆虫滞育前的 3 龄幼虫为样品, 按照 RNA Simple Total RNA Kit 试剂盒 (TIANGEN, 北京) 操作说明提取总 RNA。提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测其完整性、纯度和浓度, 然后以 1 μg 总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA 第 1 链, -20℃ 保存备用。

1.3 麦红吸浆虫 *HMGR* 基因保守区片段的扩增

根据本实验室麦红吸浆虫转录组数据库中 *HMGR* 基因 Unigene 序列设计特异性引物 (表 1)。以 1.2 节合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系 (25 μL): 2 × Taq MasterMix (康为世纪, 北京) 12.5 μL, cDNA 模板 1.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL 和 ddH₂O 9 μL。反应程序: 94℃ 预变性 7 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 5 min。反应结束后, 将扩增获得的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切割目的条带, 使用 DNA 纯化回收试剂盒 (TIANGEN, 北京) 进行纯化回收, 产物连接到 pMD™-19T 克隆载体 (TaKaRa, 大连), 转化到 DH5α 感受态细胞。经蓝白斑筛选后, 挑取白斑扩大培养, 菌液 PCR 检测后送至上海英俊公司测序。

1.4 麦红吸浆虫 *HMGR* 基因 5' 和 3' RACE 扩增及全长验证

根据 1.3 节获得的麦红吸浆虫 *HMGR* 基因中间片段序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 分别设计 5' 和 3' RACE 引物 (表 1), 按照 3' Full RACE Core Set with PrimerScript™ RTase 和 5' Full RACE Kit with TAP 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 操作说明书进行 5' 和 3' 末端序列扩增。5' RACE Outer 和 Inner PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 54℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 32 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。3' RACE Outer PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 25 个循环; 72℃ 10 min; 3' RACE Inner PCR 除循环数为 35 外, 其余条件同 3' RACE Outer PCR。反应结束后, PCR 产物进行检测、回收、连接、转化和测序, 步骤同 1.3 节。

将克隆获得的麦红吸浆虫 *HMGR* 基因中间序列与 RACE 末端序列应用 DNAMAN 6.0 软件进行拼接, 根据拼接获得的序列设计全长验证引物 (表

1),以 1.2 节合成的 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增。扩增条件、PCR 产物的检测与测序步骤同 1.3 节。

1.5 序列分析

对 1.4 节获得的麦红吸浆虫 *HMGR* 基因,利用 NCBI 数据库中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行开放阅读框预测;使用 ExPASy 数据库 (<http://www.expasy.org/>)中的 Translate 和 Protparam 工具分别进行核苷酸序列翻译和蛋白理化性质分析;使用 TMHMM Server 2.0 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行跨膜区分析,NCBI Conserved Domains Search 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白保守结构域预测;应用 I-TASSER 在线软件 (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)和 SWISS-MODEL 在线软件 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)分别进行蛋白二级和三维结构预测。应用 Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对麦红吸浆虫 *HMGR* 与其他昆虫对应蛋白序列进行同源性分析;使用 MEGA 6.0 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ)重复运行 1 000 次构建包括

麦红吸浆虫在内的 19 种昆虫 *HMGR* 全长氨基酸序列系统发育树。

1.6 qPCR 分析麦红吸浆虫 *HMGR* 基因在不同滞育和发育时期的表达水平

分别取 1.1 节中 2016 年 5 月下旬 - 2017 年 4 月上旬采集的麦红吸浆虫 1 龄和 2 龄幼虫 200 和 100 头以及滞育不同时期的 3 龄幼虫、各阶段蛹和雌雄成虫各 20 头,按照 1.2 节中方法提取总 RNA,并反转录成 cDNA。每处理重复 3 次。根据获得的麦红吸浆虫 *HMGR* 基因序列设计定量引物 *SmHMGR*-q-F 和 *SmHMGR*-q-R (表 1),以麦红吸浆虫 *GAPDH* 基因为内参基因并设计内参引物 *SmGAPDH*-q-F 和 *SmGAPDH*-q-R (表 1),在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪上检测 *HMGR* 基因在麦红吸浆虫不同滞育和发育时期的表达量,qPCR 反应体系 (20 μ L): cDNA 模板 2.0 μ L,上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 2 $\times$ SYBR Green Premix EX Taq™ II (TliRNaseH Plus) (TaKaRa, 大连) 10 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L, 超纯水 6.0 μ L。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5' - 3')	用途 Purpose
SmHMGR-F	AGCGCTTGACGACGACGACG	中间片段扩增 Amplification of intermediate fragment
SmHMGR-R	ATGGAAATATTGGGGCCAGC	
SmHMGR-3'-outer	AAACGGCTGCACAGACTGA	3'RACE
SmHMGR-3'-inner	GATCACCGACATAATTGCAAAACTG	
SmHMGR-5'-outer	ACGATGAATCAAATGGCAAATAGCA	5'RACE
SmHMGR-5'-inner	TGGCGGACACGTAGAGCA	
SmHMGR-all-F	AGTCATTGAAAATATTTCACGT	全长扩增 Amplification of the full-length sequence
SmHMGR-all-R	ATCGTAATCGAATAGTTATTCA	
SmHMGR-q-F	ATCATCACCACGACGTTTC	qPCR
SmHMGR-q-R	TCATTGCCTGTGGTCAAG	
SmGAPDH-q-F	CCATCAAAGCAAGCAAGA	
SmGAPDH-q-R	CAGCACGGAGCACAAAGAC	

1.7 数据分析

对 1.6 节获得的数据采用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法 (Livak and Schmittgen, 2001)计算麦红吸浆虫 *HMGR* 基因在不同滞育时期和不同发育阶段的相对表达量,然后进行单因素方差分析 ($P < 0.05$) 和 Duncan 氏新复极差法多重比较,分析在 SPSS 22.0 统计软件 (Chicago, IL., 美国)上进行。

2 结果

2.1 麦红吸浆虫 *HMGR* 基因克隆与序列分析

通过保守区片段扩增、3'和 5'RACE 扩增和拼接序列 PCR 验证 (图 1),成功获得了麦红吸浆虫 *HMGR* 基因 cDNA 全长序列 2 548 bp (图 2),命名为

SmHMGR (GenBank 登 录 号: MG876766)。ORF Finder 分析表明,该基因包含 2 328 bp 的 ORF,编码 775 个氨基酸,预测的蛋白分子量为 84.16 kD,理论等电点为 8.29;其起始密码子 atg 位于第 46 – 48 bp,终止密码子 tag 位于第 2 371 – 2 373 bp;3′非编码区(3′UTR)具有真核生物典型的 aataa(第 2 519 – 2 523 bp)加尾信号和 PolyA 结构。TMHMM 2.0 软件分析发现,*SmHMGR* 推导的氨基酸序列 N 端有 2 个跨膜区,分别位于第 36 – 58 和 203 – 221 位氨基酸。功能域分析显示,*SmHMGR* C 端含有 HMGR 家族典型的催化结构:两个 NADPH 底物结合基序 (DAMGMNMV 和 TVGGGT)、两个 HMG-CoA 底物结合基序 (ENVMGYVQIP 和 TTEGALVA) 和一个 class I HMG-CoA-reductase 功能域(第 336 – 734 位氨基酸),同时具有一个固醇敏感多肽区(sterol-sensing domain, SSD)(第 5 – 56 位氨基酸);此外还具有 10 个保守的 N-糖基化位点 (NXT/S), 分别位

于第 32, 181, 230, 281, 350, 634, 639, 696, 733 和 754 位氨基酸(图 2)。

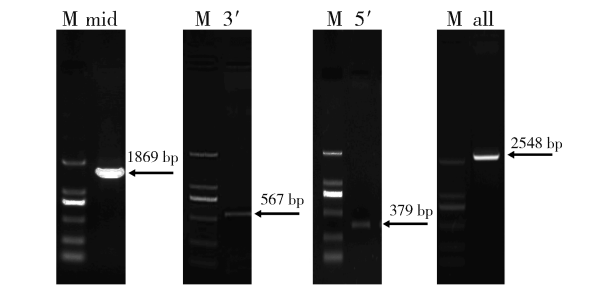


图 1 麦红吸浆虫 *HMGR* 基因 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of the *HMGR* gene from *Sitodiplosis mosellana*
M: DL2000 DNA 分子量标准 DL2000 DNA marker; mid: 中间序列 Intermediate fragment; 3': 3′ RACE 产物 3′ RACE product; 5': 5′ RACE 产物 5′ RACE product; all: 全长序列验证 Verification of full-length sequence.

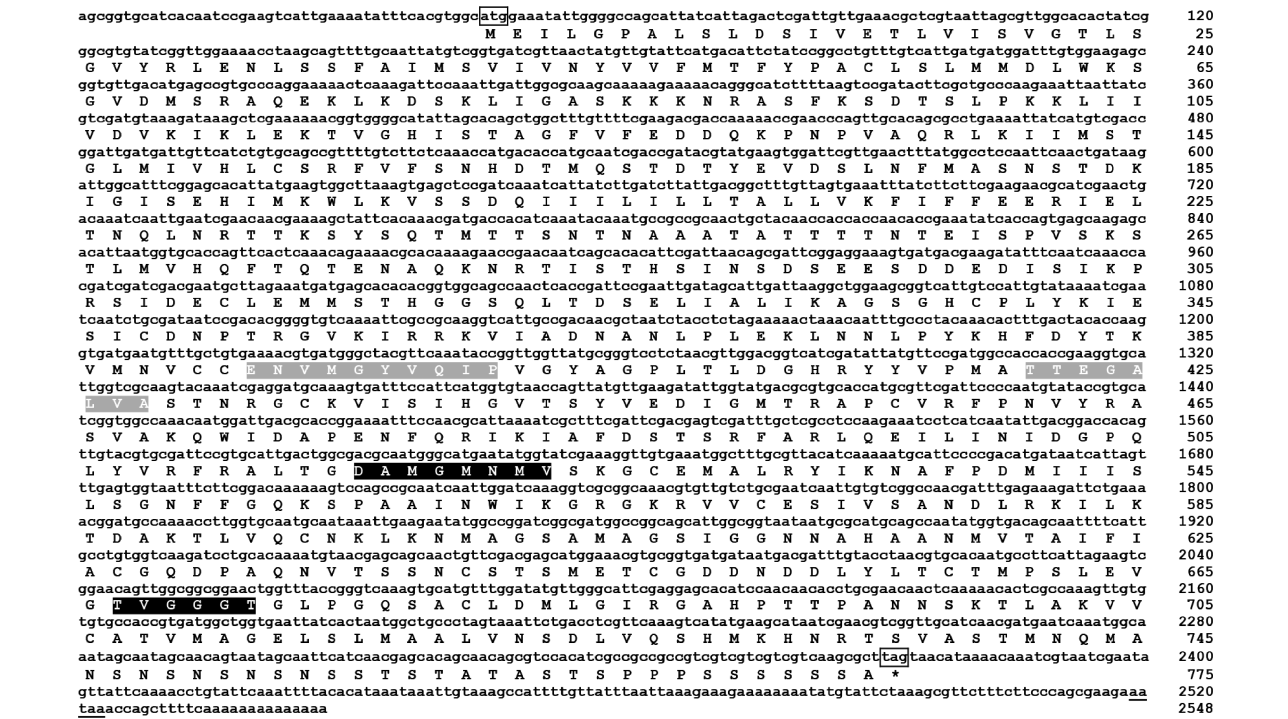


图 2 麦红吸浆虫 *SmHMGR* 基因核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SmHMGR* gene from *Sitodiplosis mosellana*

起始密码子 atg 和终止密码子 tag 用方框标注,多聚腺苷酸信号(aataa)用单下划标出,两个 HMG-CoA 结合基序用灰色标注,两个 NADPH 结合基序用黑色标注。The initiation codon atg and the termination codon tag are boxed. The putative polyadenylation signal (aataa) is single-underlined. Two HMG-CoA binding motifs are marked in grey, and two NADPH binding motifs are marked in black.

2.2 *SmHMGR* 蛋白高级结构预测

应用 I-TASSER 在线软件对 *SmHMGR* 二级结构预测发现,其多肽链含有 17 个 α 螺旋和 12 个 β 折叠,它们的氨基酸分别为 309 和 107 个,分别占

39.87% 和 13.81%,无规则卷曲氨基酸为 359 个,占 46.32%。

应用 SWISS-MODEL 同源建模服务器,以人 *Homo sapiens* 的 HMGR 蛋白(PDB ID: 3CD0)为模

板对 *SmHMGR* 进行三维结构预测,发现 *SmHMGR* 三维结构与其他物种同源蛋白三维结构高度相似。该模型由 4 个单体(图 3: A 中蓝、青、红和绿色)组成,每单体空间上折叠成“V”字形,由 N(绿色)、L(红色)和 S(蓝色)3 个结构域组成(图 3: B),其中

L 结构域包含两个 HMG-CoA 结合基序和一个 NADPH 结合基序(TVGGGT),S 结构域包含一个 NADPH 结合基序(DAMGMNV),L 和 S 结构域由一个顺式环(cis-loop)连接。

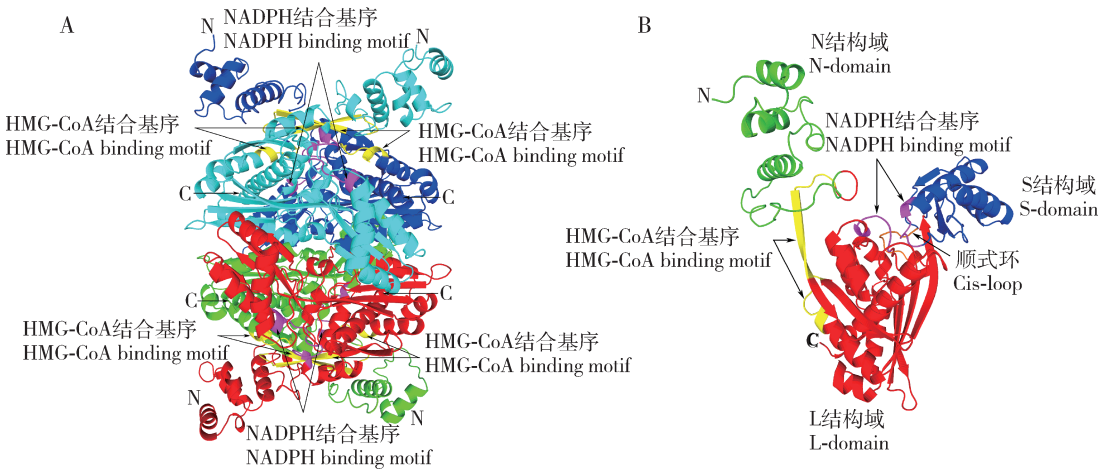


图 3 预测的麦红吸浆虫 *SmHMGR* 四聚体(A)和单体(B)三级结构

Fig. 3 Deduced three-dimensional structure of *SmHMGR* tetramer (A) and monomer (B) of *Sitodiplosis mosellana*

2.3 *SmHMGR* 氨基酸序列相似性和系统进化分析

Blastp 分析表明, *SmHMGR* 与同目长角亚目(Nematocera) 达氏按蚊 *Anopheles darling* HMGR (GenBank 登录号: ETN66344. 1) 氨基酸序列一致性最高为 72%, 与致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (GenBank 登录号: XP_001845707. 1)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (GenBank 登录号: XP_019539156. 1)、埃及伊蚊 *A. aegypti* (GenBank 登录号: XP_001659923. 1)、地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (GenBank 登录号: XP_004521277. 1)、家蝇 *Musca domestica* (GenBank 登录号: XP_019892663. 1)、嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae* (GenBank 登录号: XP_017873839. 1) 和斑翅果蝇 *D. suzukii* (GenBank 登录号: XP_016927086. 1) HMGR 的氨基酸序列一致性分别为 58% ~ 59%, 与其他 3 个目 10 种昆虫同源蛋白的氨基酸序列一致性分别为 48% ~ 50% (图 4)。系统进化分析表明, 19 种昆虫 HMGR 被分为双翅目、鳞翅目、膜翅目和鞘翅目 4 个分支, 其中 *SmHMGR* 与达氏按蚊亲缘关系最近, 其次为长角亚目其他 3 种, 与序列比对和传统分类结果一致。

2.4 麦红吸浆虫滞育前后和滞育期 *SmHMGR* 表达量变化

由图 5 可知, 麦红吸浆虫滞育不同阶段的 3 龄幼虫 *SmHMGR* 表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。

滞育前的麦穗老熟幼虫(对照)中 *SmHMGR* 表达量较低, 入土进入滞育后不变; 滞育期间(2016 年 6 – 11 月), 10 月前 *SmHMGR* 表达量维持在稳定水平, 11 月即向滞育后的过渡期 *SmHMGR* 表达量显著上升, 到滞育后静息阶段的 12 月达到最高, 为滞育前的 2.64 倍, 随后显著下降, 静息阶段的后期(2017 年 2 月下旬)降至滞育前的水平, 恢复发育的后期(4 月上旬)显著低于滞育前, *SmHMGR* 表达量仅为滞育前的 32%。

2.5 麦红吸浆虫发育变态过程中 *SmHMGR* 表达量变化

由图 6 可知, 麦红吸浆虫不同发育阶段 *SmHMGR* 表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。幼虫阶段除 2 龄幼虫后期 *SmHMGR* 表达量与蛹期各阶段差异不显著 ($P > 0.05$) 外, 其他时期(1 龄幼虫、2 龄幼虫早期和 3 龄幼虫)表达量显著高于蛹期。雌成虫 *SmHMGR* 表达量显著高于蛹期和雄成虫期的。幼虫阶段 *SmHMGR* 表达量存在剧烈变化, 2 龄幼虫中的表达量显著低于 1 龄幼虫中的(对照), 尤其 2 龄幼虫后期表达量很低, 仅为对照的 30%, 发育到 3 龄早期表达量剧烈升高(为对照的 1.03 倍), 但 3 龄幼虫后期显著下降, 预蛹期降到最低(为对照的 17%); 发育到初蛹后表达量略有升高, 蛹期各阶段变化不明显。

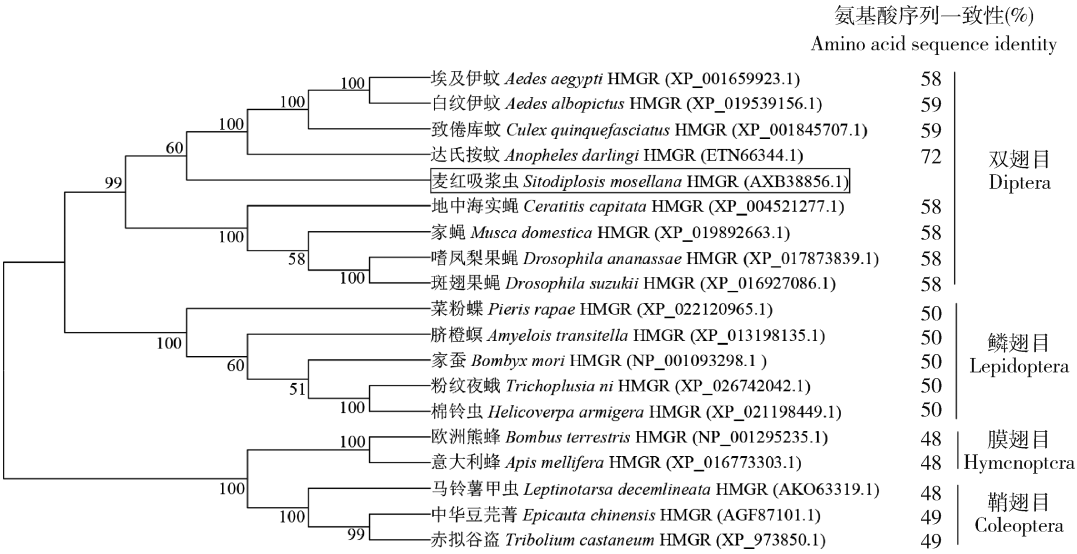


图 4 采用邻接法基于氨基酸序列构建的麦红吸浆虫与其他昆虫 HMGR 系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of HMGR from *Sitodiplosis mosellana* and other insect species
by neighbor-joining method based on the amino acid sequences

分支上的数字为 1 000 次重复的自举检验值。Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 1 000 replicates.

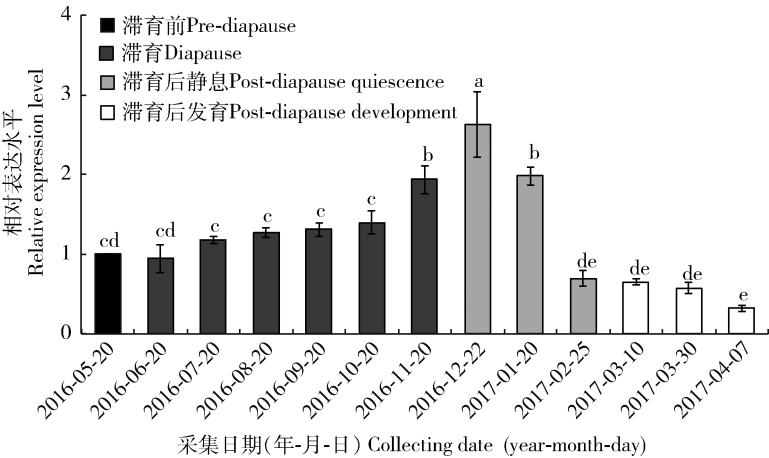


图 5 麦红吸浆虫滞育不同时期 3 龄幼虫中 *SmHMGR* 表达水平变化
Fig. 5 Relative expression level of *SmHMGR* in the 3rd instar larvae of *Sitodiplosis mosellana*
in pre-diapause, diapause and post-diapause quiescence

基因表达量以滞育前阶段(2016-05-20)的表达量为基准。图中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上不同字母表示经 Duncan 氏多重比较后差异显著 ($P < 0.05$)。The expression level of gene was normalized to that at the pre-diapause stage (2016-05-20). The data in the figure are mean $\pm$ SE. Different letters above bars show significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). 图 6 同 The same for Fig. 6.

3 讨论

本研究首次克隆得到麦红吸浆虫 *SmHMGR* 基因全长 cDNA 序列, 该基因编码的蛋白不仅与已报道的同目长角亚目昆虫 HMGR 序列一致性高, 亲缘关系最近, 而且具有 HMGR 蛋白家族典型的 NADPH 和 HMG-CoA 底物结合基序以及 class I HMG-CoA-reductase 催化功能域, 表明该基因在进化

过程中结构和功能高度保守, 即在保幼激素(JH)合成途径关键限速步骤——HMG-CoA 向甲羟戊酸转化中起重要调控作用(Friesen and Rodwell, 2004; 雷桅等, 2008)。SmHMGR 有多个跨膜区域, 且含有多个糖基化位点, 说明是一种锚定于膜上起调节作用的糖蛋白。尽管昆虫与脊椎动物不同, 甲羟戊酸途径的终产物是 JH 不是胆固醇, 但在 SmHMGR 及多种昆虫如中华豆芫菁 *Epicauta chinensis*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和辣根猿叶甲 *Phaedon*

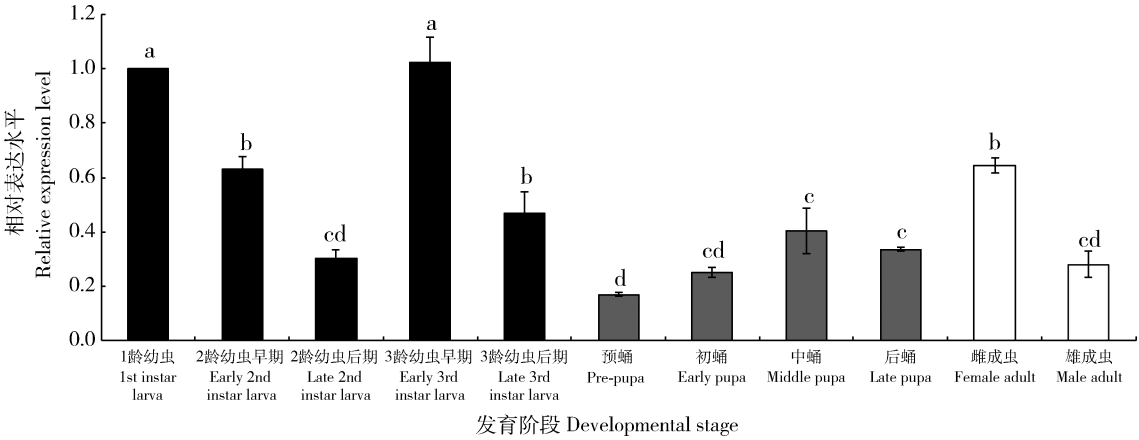


图 6 麦红吸浆虫不同发育阶段 *SmHMGR* 的表达水平

Fig. 6 Relative expression level of *SmHMGR* in *Sitodiplosis mosellana* at different developmental stages

蛹阶段依据复眼和翅芽的发育程度和颜色区分；基因表达量以 1 龄幼虫中的表达量为基准。Pupal stages are distinguished based on the development degree and color of compound eyes and wing buds. The expression level of gene was normalized to that in the 1st instar larva.

cochleariae HMGR 中发现了固醇敏感多肽区 (SSD) (Burse et al., 2008; Lü et al., 2016), SSD 在胆固醇自我平衡调节中发挥重要作用(胡广安, 2003), 其在昆虫 JH 动态平衡有何作用尚不清楚, 值得进一步研究。

幼虫滞育是最大的昆虫滞育类群, 普遍认为 JH 在幼虫滞育的诱导和维持中发挥重要作用, 高水平的 JH 诱导滞育的发生, 并在滞育期间通过抑制蜕皮激素 (molting hormone, MH) 的分泌阻止形态发生变化 (Yagi and Akaike, 1976; Eizaguirre et al., 2005; Jiang et al., 2011)。本研究表明, *SmHMGR* 在麦红吸浆虫滞育前的 3 龄早期幼虫中的表达量显著高于 2 龄幼虫的, 进入滞育后一直维持较高水平, 并在滞育后静息阶段的当年 12 月和翌年 1 月达到最高, 与该虫滞育进程中 JH 滴度及其信号传导途径相关基因 *SmMet* 和 *SmKr-h1* (李英梅等, 2006; Cheng et al., 2018) 表达水平变化一致, 说明高水平的 *SmHMGR* 表达可能刺激酶活性提高, 从而促进 JH 合成, 在滞育诱导、维持以及滞育后静息状态的维持中发挥作用。值得说明的是, 麦红吸浆虫滞育后静息阶段的当年 12 月 MH 滴度也显著升高, 其作用是诱导滞育终止, 而此时高的 JH 滴度抑制了发育 (成卫宁等, 2009; Cheng et al., 2017)。

众所周知, JH 和 MH 协同作用调控昆虫发育变态, 全变态类昆虫末龄幼虫 JH 滴度下降, MH 滴度升高时引起幼虫到蛹的转变 (Bhaskaran et al., 1986; Kinjoh et al., 2007; Jindra et al., 2013; Ureña et al., 2016; Kayukawa et al., 2017)。我们前期也发现, 麦红吸浆虫化蛹前 MH 滴度显著升高, JH 受

体基因 *SmMet* 及其下游转录因子基因 *SmKr-h1* 表达量明显降低 (成卫宁等, 2009; Cheng et al., 2018)。本研究中, *SmHMGR* 在预蛹和蛹期表达量显著低于 3 龄幼虫期, 与 *SmKr-h1* 表达变化一致, 说明 *SmHMGR* 基因表达量的降低利于幼虫的变态, 与 Li 等 (2016) 对马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的研究结论一致。

近年来的研究也表明, HMGR 参与昆虫生殖活动的调控。例如棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 雌成虫 HMGR 基因被干扰后, 卵黄原蛋白转录水平、产卵量和生殖力显著降低 (Wang et al., 2013); 太平洋折翅蠨成虫 HMGR 沉默后, JH 合成受阻、卵母细胞发育减慢 (Huang et al., 2015)。本研究中 *SmHMGR* 在雌成虫中表达量显著高于在蛹和雄成虫中的, 与 *SmMet* 和 *SmKr-h1* 以及埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 JH 滴度和 HMGR 基因表达变化趋势 (Nouzova et al., 2011) 一致, 推测该基因可能参与麦红吸浆虫生殖力的调控。

综上所述, 本研究首次成功克隆出麦红吸浆虫 *SmHMGR* 基因, 该基因在麦红吸浆虫滞育和发育变态进程中的表达变化与其 JH 滴度及信号转录因子基因 *SmMet* 和 *SmKr-h1* 变化基本一致, 推测该基因可能是影响 JH 调控麦红吸浆虫发育的重要因子。该结果不仅为深入理解麦红吸浆虫发育生物学, 而且为进一步研发昆虫生长调节剂类农药奠定了基础。

参考文献 (References)

Bajgar A, Jindra M, Dolezel D, 2013. Autonomous regulation of the

- insect gut by circadian genes acting downstream of juvenile hormone signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(11): 4416–4421.
- Bhaskaran G, Sparagana SP, Barrera P, Dahm KH, 1986. Change in corpus allatum function during metamorphosis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: regulation at the terminal step in juvenile hormone biosynthesis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3(4): 321–338.
- Burse A, Frick S, Schmidt A, Buechler R, Kunert M, Gershenzon J, Brandt WG, Boland W, 2008. Implication of HMGR in homeostasis of sequestered and *de novo* produced precursors of the iridoid biosynthesis in leaf beetle larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(1): 76–88.
- Cheng WN, Li JJ, Li YP, Li XL, Wu JX, Wang HL, 2009. Quantitative analysis of ecdysteroid in adults and the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* Gehin. *Acta Phytopy. Sin.*, 36(2): 163–167. [成卫宁, 李建军, 李怡萍, 李修炼, 仵均祥, 王洪亮, 2009. 麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中蜕皮激素的定量分析. 植物保护学报, 36(2): 163–167]
- Cheng WN, Li XJ, Zhao JJ, Zhu-Salzman KY, 2018. Cloning and characterization of Methoprene-tolerant (Met) and Kruppel homolog 1 (Kr-h1) genes in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*. *Insect Sci.*, <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12638>.
- Cheng WN, Long ZR, Zhang YD, Liang TT, Zhu-Salzman KY, 2017. Effects of temperature, soil moisture and photoperiod on diapause termination and post-diapause development of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae). *J. Insect Physiol.*, 103: 78–85.
- Couillaud F, Feyerisen R, 1991. Assay of HMG-CoA synthase in *Diploptera punctata* corpora allata. *Insect Biochem.*, 21(2): 131–135.
- Debernard S, Rossignol F, Couillaud F, 1994. The HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin inhibits insect juvenile hormone biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95(1): 92–98.
- Eizaguirre M, Prats J, Abellana M, López C, Llovera M, Canela R, 1998. Juvenile hormone and diapause in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 44(5): 419–425.
- Eizaguirre M, Schafellner C, López C, Sehna F, 2005. Relationship between an increase of juvenile hormone titer in early instars and the induction of diapause in fully grown larvae of *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 51(10): 1127–1134.
- Friesen JA, Rodwell VW, 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.*, 5(11): 248.
- Gertler FB, Chiu CY, Richter-Mann L, Chin DJ, 1988. Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Cell. Biol.*, 8(7): 2713–2721.
- Hu GA, 2003. Molecular evolution of sterol-sensing domain. *J. Henan Normal Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 31(1): 89–92. [胡广安, 2003. 固醇敏感多肽区(sterol-sensing domain)的分子进化. 河南师范大学学报(自然科学版), 31(1): 89–92]
- Huang J, Marchal E, Hult EF, Tobe SS, 2015. Characterization of the juvenile hormone pathway in the viviparous cockroach, *Diploptera punctata*. *PLoS ONE*, 10(2): e0117291.
- Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, 2011. Juvenile hormone changes associated with diapause induction, maintenance, and termination in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(3): 134–144.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 181–204.
- Kayukawa T, Jouraku A, Ito Y, Shinoda T, 2017. Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(5): 1057–1062.
- Kinjo T, Kaneko Y, Itoyama K, Mita K, Hiruma K, Shinoda T, 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(8): 808–818.
- Košťál V, 2006. Eco-physiological phase of insect diapause. *J. Insect Physiol.*, 52(2): 113–127.
- Lamb RJ, McKenzieil RIH, Wise IL, Barker PS, Smith MAH, 2000. Resistance to *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) in spring wheat (Gramineae). *Can. Entomol.*, 132(5): 591–605.
- Lei W, Tang SH, Zhou QG, Shui XR, Sun YM, Sun M, 2008. Bioinformatics analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) in isoprenoid biosynthesis of mulberry. *Sci. Seric.*, 34(3): 393–399. [雷桅, 汤绍虎, 周启贵, 税晓容, 孙一铭, 孙敏, 2008. 桑蓇类生物合成酶 HMGR 的生物信息学分析. 蚕业科学, 34(3): 393–399]
- Li Q, Meng QW, Lü FG, Guo WC, Li GQ, 2016. Identification of ten mevalonate enzyme-encoding genes and their expression in response to juvenile hormone levels in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Gene*, 584(2): 136–147.
- Li S, Jiang RJ, Cao MX, 2004. Metabolism of juvenile hormone. *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 389–393. [李胜, 蒋容静, 曹梅讯, 2004. 保幼激素的代谢. 昆虫学报, 47(3): 389–393]
- Li YM, Kai ZP, Huang J, Tobe SS, 2017. Lepidopteran HMG-CoA reductase is a potential selective target for pest control. *Peer J.*, 5: e2881.
- Li YM, Wu JX, Cheng WN, Li YP, Hou JJ, 2006. Determination of juvenile hormone in wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin). *Acta Agric. Bor.-occid. Sin.*, 15(4): 73–75. [李英梅, 仵均祥, 成卫宁, 李怡萍, 侯娟娟, 2006. 麦红吸浆虫保幼激素含量测定. 西北农业学报, 15(4): 73–75]
- Liu Y, Sheng ZT, Jiang RJ, Huang Y, Li S, 2007. Progress in juvenile hormone synthesis. *Acta Entomol. Sin.*, 50(12): 1285–1292. [刘艳, 胜振涛, 蒋容静, 黄原, 李胜, 2007. 保幼激素合成的研究进展. 昆虫学报, 50(12): 1285–1292]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

- Methods*, 25(4): 402–408.
- Lü S, Jiang M, Huo T, Li X, Zhang Y, 2016. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: an essential actor in the biosynthesis of cantharidin in the blister beetle *Epicauta chinensis* Laporte. *Insect Mol. Biol.*, 25(1): 58–71.
- Miao J, Wu YQ, Gong ZJ, He YZ, He YD, Duan Y, Jiang YL, 2013. Long-distance wind-borne dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera: Cecidomyiidae) in northern China. *J. Insect Behav.*, 26(1): 120–129.
- Munyiri FN, Ishikawa Y, 2004. Endocrine changes associated with metamorphosis and diapauses induction in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothaea hilaris*. *J. Insect Physiol.*, 50(11): 1075–1081.
- Nouzova M, Edwards MJ, Mayoral JG, Noriega FG, 2011. A coordinated expression of biosynthetic enzymes controls the flux of juvenile hormone precursors in the corpora allata of mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(9): 660–669.
- Pamminger T, Buttstedt A, Norman V, Schierhorn A, Botías C, Jones JC, Basley K, Hughes WO, 2016. The effects of juvenile hormone on *Lasius niger* reproduction. *J. Insect Physiol.*, 95: 1–7.
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, Shen YC, 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137(7): 1117–1126.
- Roy S, Saha TT, Zou Z, Raikhel AS, 2018. Regulatory pathways controlling female insect reproduction. *Annu. Rev. Entomol.*, 63: 489–511.
- Shrestha G, Reddy GVP, 2019. Field efficacy of insect pathogen, botanical, and jasmonic acid for the management of wheat midge *Sitodiplosis mosellana* and the impact on adult parasitoid *Macroglanes penetrans* populations in spring wheat. *Insect Sci.*, 26(3): 523–535.
- Singtripop T, Manaboon M, Tatun N, Kaneko Y, Sakurai S, 2008. Hormonal mechanisms underlying termination of larval diapause by juvenile hormone in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *J. Insect Physiol.*, 54(1): 137–145.
- Singtripop T, Wanichacheewa S, Sakurai S, 2000. Juvenile hormone-mediated termination of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30(9): 847–854.
- Smykal V, Bajgar A, Provaznik J, Fexova S, Buricova M, Takaki K, Hodkova M, Jindra M, Dolezel D, 2014. Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 45(1): 69–76.
- Tian G, Cheng LL, Qi XW, Ge ZH, Niu CY, Zhang XL, Jin SX, 2015. Transgenic cotton plants expressing double-stranded RNAs target *HMG-CoA reductase* (*HMGR*) gene inhibits the growth, development and survival of cotton bollworms. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(11): 1296–1305.
- Ureña E, Chafino S, Manjón C, Franch-Marro X, Martín D, 2016. The occurrence of the holometabolous pupal stage requires the interaction between E93, Krüppel-homolog 1 and Broad-complex. *PLoS Genetics*, 12(5): e1006020.
- Wang ZJ, Dong YC, Desneux N, Niu CY, 2013. RNAi silencing of the HaHMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm. *PLoS ONE*, 8(7): e67732.
- Wu YQ, Miao J, Duan Y, Jiang YL, Gong ZJ, 2011. Research and Control of Orange Wheat Blossom Midge. Science Press, Beijing. 14–15. [武予清, 苗进, 段云, 蒋月丽, 巩中军, 2011. 麦红吸浆虫的研究与防治. 北京: 科学出版社. 14–15]
- Yagi S, Akaike N, 1976. Regulation of larval diapause by juvenile hormone in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.*, 22(3): 389–392.
- Yin CM, Chippendale GM, 1973. Juvenile hormone regulation of the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *J. Insect Physiol.*, 19(12): 2403–2420.
- Zapata R, Piulachs MD, Bellés X, 2013. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase lower fecundity in the German cockroach; correlation between the effects on fecundity *in vivo* with the inhibition of enzymatic activity in embryo cells. *Pest Manag. Sci.*, 59(10): 1111–1117.

(责任编辑: 马丽萍)